



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>G01N 33/53</b>		<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/42827</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. August 1999 (26.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00460 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 1999 (19.02.99)  (30) Prioritätsdaten: 198 07 338.0 20. Februar 1998 (20.02.98) DE 198 07 339.9 20. Februar 1998 (20.02.98) DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): WOLF- BEIS, Otto, Samuel [AT/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 35/127, D-93055 Regensburg (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MIRSKY, Vladimir [RU/DE]; Wieshuberstrasse 3, D-93059 Regensburg (DE). RIEPL, Michael [DE/DE]; Oberhaselbach 38, D-84066 Mallersdorf (DE).  (74) Anwalt: LINDNER, Manfred, K.; Gottfried-Böhm-Ring 25, D-81369 München (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: DEVICE FOR DETECTING OLIGONUCLEOTIDE AND/OR POLYNUCLEOTIDE HYBRIDIZATION (54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR DETEKTION VON OLIGO- UND/ODER POLYNUKLEOTID-HYBRIDISIERUNGEN (57) Abstract The invention relates to a device enabling the detection of oligonucleotide and/or polynucleotide. The invention further relates to an array enabling detection of different oligonucleotides and/or polynucleotides by means of electrochemical measurements. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung, mit der die Hybridisierung von Oligo- und/oder Polynukleotiden nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus betrifft die Erfindung eine Anordnung, mit der verschiedene Oligo- und/oder Polynukleotide mittels elektrochemischer Messungen nachgewiesen werden können.			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

533 Rec'd PCT/PTO 14 AUG 2000

**Vorrichtung zur Detektion von Oligo- und/oder Polynukleotid-Hybridisierungen**

5

**Beschreibung**

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung mit der die Hybridisierung von Oligo- und/oder Polynukleotiden nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus betrifft die Erfindung eine Anordnung, mit der verschiedene Oligo- und/oder Polynukleotide mittels elektrochemischer Messungen nachgewiesen werden können.
- 15 Hybridisierungen von Oligo- und Polynukleotiden mit den unterschiedlichsten Nukleinsäureträgermaterialien und Wechselwirkungen spezifischer Enzyme mit solchen Trägermaterialien, die eingesetzt werden, um Desoxyribonukleinsäuren oder Ribonukleinsäuren zu modifizieren, sind in allen Bereichen der Molekularbiologie von besonderem Interesse. Deshalb wird der Nachweis von spezifischen Sequenzen auf vielen
- 20 Gebieten in zunehmendem Maße immer wichtiger, z.B. in der klinischen Diagnostik. Die Analyse von biomolekularen Wechselwirkungen ist ein vielseitiges Werkzeug um die Bindung von beispielsweise Rezeptor-Liganden-Paaren ohne radioaktive Markierung zu bestimmen.
- 25 Insbesondere die DNA als Träger vererbter oder implementierter Information ist in den letzten Jahren zum wichtigsten Forschungsobjekt der Bioanalytik geworden. Durch die Aufklärung der Sequenzen der Genome erhofft man sich einen Einblick in die molekularbiologischen Grundlagen des Lebens und damit auch in Abweichungen von der „Normalität“. Die Abweichungen können natürlicher Art sein und in Folge zu Krankheiten führen, können aber
- 30 auch erst durch gentechnische Veränderungen hervorgerufen sein, um z.B. eine gezielte Resistenz zu bewirken.

Der Nachweis derartiger „Abweichungen“ oder Veränderungen gehört demnach zu den wichtigsten Aufgaben der gegenwärtigen Bioanalytik. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß ohne eine hochqualifizierte Bioanalytik der Nachweis genetischer Veränderungen nicht möglich ist.

5

Verschiedene Verfahren zum Nachweis von genetischen Veränderungen oder zum Nachweis von der Nukleotidsequenzen in Genen sind bekannt. Zu diesen Verfahren gehört auch die Nukleinsäure-Hybridisierung. Unter Hybridisierung versteht man generell die unter bestimmten Bedingungen durch Basenpaarung bewirkte Ausbildung doppelsträngiger Nukleinsäuren aus zwei vollständig voneinander getrennten, einzelsträngigen Nukleinsäure-Molekülen. Dabei wird zwischen DNA-DNA-Hybridisierung und DNA-RNA-Hybridisierung unterschieden. Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Hybridisierungstechniken, beispielsweise Sättigungshybridisierung, Plus-Minus-Hybridisierung, Sandwich-Hybridisierung, Erschöpfungshybridisierung, Kompetitions-hybridisierung, bekannt. Diese Hybridisierungstechniken werden unterteilt in Flüssigkeitshybridisierung und Filterhybridisierung. Bei der Flüssigkeitshybridisierung befinden sich beide Reaktionspartner in Lösung und bei der Filterhybridisierung ist einer der Reaktionspartner an einen Filter gebunden, der dann in einer Lösung inkubiert wird, die den zweiten Reaktionspartner enthält. Um unspezifische Reaktionen zwischen der in Lösung befindlichen Nukleinsäure und dem Filtermaterial zu unterdrücken, werden der Hybridisierungslösung meist Blockierungsreagenzien zugegeben.

Nachteilig an diesen Verfahren ist der Einsatz von radioaktiv markierten Verbindungen, um eine Hybridisierung nachweisen zu können. Diese Verfahren können auch nur an Arbeitsplätzen durchgeführt werden, an denen das Arbeiten mit diesen Substanzen erlaubt ist. Alle verwendeten Materialien müssen eigens entsorgt werden, diese Entsorgungsprobleme machen diese Verfahren vergleichsweise teuer. Darüber hinaus ist es nur sehr begrenzt möglich, voneinander verschiedene Oligo- oder Polynukleotide in einem Verfahrensschritt mittels einer dafür ausgestatteten Anordnung nachzuweisen, dies bedeutet, daß jeder Nachweis meistens einzeln geführt werden muß. Eine Massenanalyse mittels eines Arrays in einem Schritt kann nur mit großem Aufwand durchgeführt werden und ist auf eine sehr geringe Anzahl von parallelen Messungen beschränkt.

Gerade in der Bioanalytik wurden in den letzten Jahren große Anstrengungen unternommen mit Hilfe von Biosensoren Nachweissysteme für die unterschiedlichsten Anforderungen zu entwickeln. Diese Sensoren werden immer häufiger benötigt, um Analysen rasch und am Ort des Geschehens durchzuführen. Dafür werden insbesondere Moleküle benötigt, die das Ziel erkennen können. Gleichzeitig müssen die vielen anderen ebenfalls vorhandenen Stoffe ignoriert werden. Ein Biosensor muß also die Voraussetzung erfüllen, daß der Vorgang der Erkennung/Bindung nachgewiesen und in ein meßbares Signal „übersetzt“ werden kann. Diese „Übersetzung“ stößt jedoch auf Schwierigkeiten, so daß ein Bedarf an einem einfach durchführbaren Nachweissystem besteht. Sowohl für Monosysteme als auch für multiple Systeme ist es erforderlich, daß die komplementären und/oder teilweise komplementären Sequenzen der nachzuweisenden Oligo- und/oder Polynukleotide immobilisiert auf einer Oberfläche angeordnet sind. Aus dem Stand der Technik ist ein solches System nicht bekannt.

15 Neben den oben beschriebenen Hybridisierungsverfahren wurden in den letzten Jahren weitere Verfahren entwickelt, um Bindungen zwischen Oligo- oder Polynukleotiden mit Nukleinsäuren nachzuweisen. Grundlegendes Prinzip ist die sensitive Bestimmung von Änderungen des Brechungsindex auf einer Wellenleiteroberfläche, die zu einer wirksamen Diskriminierung zwischen gebundenen und nicht gebundenen Spezies führt. Zu diesen Bestimmungsmethoden gehört auch die Oberflächenplasmonresonanzmethode (SPR).

Bei der SPR werden die Änderungen im Brechungsindex in einer Schicht, die auf einer dünnen Metallschicht aufgebracht ist, durch konsequente Änderung der Intensität eines reflektierenden Lichtstrahls detektiert. Sensitive Oberflächen, die in der SPR eingesetzt werden, sind in der EP 0 589 687 beschrieben. Nachteilig an diesen sensiblen Oberflächen ist jedoch, daß sie nur für dieses SPR-Verfahren eingesetzt werden können, da bei diesem Verfahren sehr gute Leitfähigkeitseigenschaften des Metalls Voraussetzung sind, um die Änderungen im Brechungsindex nachzuweisen. Andere Metalle als die hier beschriebenen Metalle Gold, Silber, Aluminium, Kupfer haben eine niedrigere Leitfähigkeit und sind deshalb zu schlecht für das SPR-Verfahren. Auch bei diesem Verfahren ist es nicht möglich, eine größere Anzahl gleichzeitiger Nachweise mit einer einzigen Vorrichtung oder Anordnung zu führen.

Auf Grund der oben beschriebenen Nachteile der bisher bekannten Verfahren, besteht deshalb ein Bedarf an Nachweissystemen, die ohne radioaktive Markierungen auskommen, mit denen die Hybridisierung von Oligo- und/oder Polynukleotiden nachgewiesen werden kann, die  
5 universell und die darüber hinaus auch als Multisensorarray einsetzbar sind.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, eine Vorrichtung zu schaffen, mit der in einfacher Weise die Hybridisierungen von Oligo- und/oder Polynukleotiden nachgewiesen werden können und mit denen die oben genannten Nachteile vermieden werden können.

10

Eine weitere Aufgabe besteht darin, eine Anordnung bereitzustellen, mit der es möglich ist, die Hybridisierung verschiedener Oligo- und/oder Polynukleotiden in einem und/oder mehreren Verfahrensschritten nachzuweisen.

15 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird dadurch gelöst, daß eine Vorrichtung bereitgestellt wird, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie eine Elektrode aus einem Metall oder einer Metall(Legierung) mit einer sensitiven Oberfläche aufweist, die Monoschicht oder einen Monoschicht-Rezeptor umfaßt, die bzw. der auf dieser Elektrodenoberfläche immobilisiert ist. Die Metall(Legierung) wird zunächst mit einer Verbindung, ausgewählt aus  
20 der Gruppe, bestehend aus HS-X, S=X, X-S-S-Y oder XSi(R<sub>3</sub>), wobei X und Y beliebige Molekülfragmente darstellen, insbesondere funktionalisierte oder unfunktionalisierte Alkylfragmente, quervernetzende Verbindungen, insbesondere solche, die konjugierte Doppel- und/oder Dreifachbindungen aufweisen und R für -OH und/oder ein und/oder mehrere identische und/oder verschiedene Halogene steht besonders bevorzugt sind  
25 Mercaptohexadecansäure, 16-Mercaptohexadecanamin, aktiviert, um dann über eine Metall-Schwefel-Bindung eine Monoschicht auszubilden, an die dann komplementäre oder teilweise komplementäre Oligo- und/oder Polynukleotide, PNA oder Antikörper/Antigene kovalent gebunden werden. Darüber hinaus hat sich der Einsatz von HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-(SiR<sub>2</sub>-O-SiR<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-SH, wobei n=2 bis 25, m=1 bis 10, w=2 bis 25 für dieses Verfahren als ebenso  
30 vorteilhaft erwiesen wie die Verwendung von Epoxy-terminierten Alkylthiolverbindungen.

Das Nachweisverfahren zeichnet sich dadurch aus, daß Änderungen auf oder innerhalb der sensitiven Oberfläche der Elektrode, daß heißt die Hybridisierung von komplementären oder teilweise komplementären Oligo- und/oder Polynukleotidsequenzen, mittels elektrochemischer Meßmethoden, insbesondere kapazitiver Meßmethoden nachgewiesen werden.

Die erfindungsgemäße Elektrode und/oder Elektrodenanordnung kann deshalb je nach Verwendung als Biosensor, Chemosensor, DNA-Sonde oder als Array mit beliebiger Anzahl gleicher oder verschiedenen Elektroden eingesetzt werden. Diese Verwendung hat den Vorteil, daß die erfindungsgemäße Vorrichtung direkt in einem Probenmedium eingesetzt werden kann, ohne daß langwierige Reinigungsschritte der nachzuweisenden Substanzen notwendig werden. Außerdem ist es möglich Metallschichten von beliebiger Dicke oder Geometrie einzusetzen.

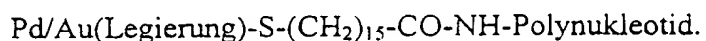
Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung und dem Verfahren ist es nun möglich, Oligo- und/oder Polynukleotide, insbesondere Desoxyribonukleinsäuren (DNA), Ribonukleinsäuren (RNA), synthetische Polyamid- oder Peptidnukleinsäuren (PNA), Nukleinsäuren, die ganz oder teilweise zueinander komplementär sind nachzuweisen, sowie die Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Antigenen zu detektieren. Darüber hinaus können je nach Art des Rezeptors, der an der sensitiven Oberfläche der Elektrode gebunden ist, Viren, Phagen, Prionen, Mikroorganismen und dergleichen nachgewiesen werden.

Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Elektrode in einem Sensorenarray, der sich aus vielen einzelnen Elektroden zusammensetzt, ist es nun möglich, in einem und/oder mehreren Verfahrensschritten eine Vielzahl der unterschiedlichsten Fragmente nachzuweisen.

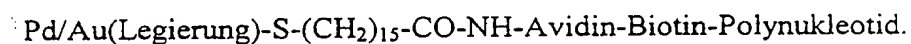
Der Aufbau der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird nun im folgenden beschrieben. Als Material für die Elektrode eignet sich jede feste leitende oder halbleitende Substanz, vorzugsweise ein Metall, wie Ag, Au, Pt, Pd, eine Legierung, insbesondere Au/Pd, Ag/Pd, Au/Cr, ein Halbleiter, z.B. GaAs, Si, Ge.

Besonders bevorzugt ist eine Elektrode, die aus einem Silizium-Wafer-Stückchen, daß zunächst mit einer Titan-Palladium- oder Chromschicht als Haftvermittler versehen wird und anschließend mit einer Legierung aus Palladium und Gold im Verhältnis von mindestens 65 % Au und bis zu 35 % Pd, beschichtet wird, besteht. Die so beschichtete Elektrode wird dann mit 16-Mercaptohexadecansäure behandelt. Auf diese alkylthiolbeschichteten Elektrodenoberfläche werden dann die komplementären oder teilweise komplementären Oligo- und/oder Polynukleotidsequenzen der nachzuweisenden Sequenzen immobilisiert. Diese Immobilisierung kann durch unterschiedliche Verfahren erfolgen.

(1) Wenn eine aminoterminal Sequenz verwendet wird, wird zuerst die endständige COOH-Gruppe der 16-Mercaptohexadecansäure durch beispielsweise N-Hydroxysuccinimid aktiviert. Die Elektrode besitzt dann nach der chemischen Kopplung folgende Struktur:



(2) Wenn biotinylierte Polynukleotidsequenzen muß die Immobilisierung von Avidin an den aktivierten endständigen COOH-Gruppen der 16-Mercaptohexadecansäure erfolgen und die Polynukleotidsequenz wird durch die Avidin-Biotin-Bindung mit der sensitiven Oberfläche verknüpft. Die Elektrode besitzt dann nach der chemischen Kopplung folgende Struktur:



Anschließend wird das Verfahren derart durchgeführt, daß die Hybridisierung der nachzuweisenden Sequenzen mittels elektrochemischer Messungen, insbesondere der Kapazitätsänderung auf und innerhalb der sensitiven Oberfläche der Elektrode nachgewiesen werden kann.

Darüber hinaus kann die Hybridisierung mit weiteren elektrochemischen Methoden, z.B. Impedanzmessungen, Voltammetrie, Messung nicht-linearer Impedanzeigenschaften, Chronoamperometrie und Chronopotentiometrie detektiert werden. Alle diese Verfahren können sowohl mit als auch ohne Marker durchgeführt werden. Unter der Messung der nicht-linearen Impedanzeigenschaften versteht man vorzugsweise die Messung der zweiten und dritten Oberschwingung, sowie die des kapazitiven Stromes, die sehr empfindlich auf



elektrische oder mechanische Änderungen an der Rezeptorschicht reagieren. Diese Verfahren sind sowohl für die Elektrode als auch für einen Elektrodenarray anwendbar.

Die Detektion der Hybridisierung von Oligo und/oder Polynukleotiden ist auch mit Hilfe von  
5 Fluoreszenzmarkern und Interkalationsfarbstoffen möglich. Um das Problem des Quenchings auf der Metalloberfläche der Elektrode zu vermeiden, ist es notwendig, zwischen dem Marker und der Metalloberfläche der Elektrode eine gewisse Distanz zu schaffen. Es wurde gefunden, daß ein an die Metalloberfläche der Elektrode gebundener Rezeptor, beispielsweise ein DNA-Doppelstrang mit interkaliertem Marker/Fluoreszenzfarbstoff durch die elektrisch gesteuerte  
10 Desorption, die die Thiol-Metall-Bindung der darunterliegenden dielektrischen Basisschicht löst, von der Elektrodenoberfläche entfernt wird. Die Detektion der daraus resultierenden Fluoreszenz/Markerfärbung kann mit einem Fluorimeter oder Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Dieses Verfahren wird ebenfalls bei Oligo- oder Polynukleotideinzelsträngen oder anderen Rezeptoren angewendet, wobei der Marker kovalent oder adsorptiv an die Moleküle bindet.

15

Um unspezifische Adsorptionen auf der Elektrodenoberfläche zu vermeiden, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Elektrodenoberfläche mit fluorierten Verbindung wie  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-(\text{CF}_3)_m-\text{CF}_3$  zu behandeln, wobei  $n=0$  bis 15 und  $m=0$  bis 25 und  $m+n$  größer gleich 2 sind.

20 Außerdem wurde gefunden, daß sich für die Hybridisierungsreaktion ein Puffersystem aus 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM EDTA (TE-Puffer) ebenso gut eignet wie ein Puffersystem aus 5 mM Imidazol, 100 mM NaCl, pH 7,1 (Imidazolpuffer). Je nach Verwendung können aber auch auf Phosphat oder Acetat basierende Puffer verwendet werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Sensor ist es möglich, 100 bis 200 nmol/l Oligo- bzw.  
25 Polynukleotid in Abhängigkeit vom verwendeten Sensor und dem nachzuweisenden Oligo- bzw. Polynukleotid zu detektieren.

Darüber hinaus wurde festgestellt, daß ein Temperaturbereich von 5°C bis 50°C, insbesondere 22°C bis 37°C für die Hybridisierungsreaktion optimal ist.

30

Das Verfahren der vorliegenden Erfindungen wird nun mit Hilfe der beigelegten Abbildungen näher erläutert. Es zeigen:

Figur 1 die kovalente Immobilisierung einer biotinylierten Polynukleotidsequenz auf einer Elektrode, die mit 16-Mercaptohexadecansäure und Avidin beschichtet wurde, die Beschichtung wurde mittels Kapazitätsänderungen verfolgt,

5

Figur 2 die kapazitive Detektion der Hybridisierung unterschiedlicher komplementärer Polynukleotidfragmente, wobei der komplementäre Strang kovalent an eine  $\omega$ -funktionalisierte Alkylthiolschicht auf einer Goldlegierung gebunden ist,

10 Figur 3 die Kinetik der DNA-Hybridisierung bei Zugabe einer bestimmten DNA-Konzentration,

Figur 4 die Gesamtänderung der Kapazität, aufgeteilt auf die Einzelschritte der Sensorvorbereitung und der Anwendung,

15

Figur 5 die Kapazitätsänderung bei der Hybridisierung bei Verwendung der oben beschriebenen unterschiedlichen Immobilisierungstechniken,

Figur 6 den Vergleich der Kapazitätsänderung einer DNA-Sonde bei Zugabe von  
20 komplementären und nicht-komplementären Oligonukleotidsequenzen, und

Figur 7 den Nachweis von Bakteriophagen bei Zugabe verschiedener Bakteriophagenkonzentrationen.

25 Die Abbildungen werden nun im einzelnen erläutert.

Figur 1 zeigt die Kapazitätsänderung in Abhängigkeit von der Zeit bei der Immobilisierung von biotinylierte Polynukleotidsequenzen, wobei zunächst Avidin an den aktivierten endständigen COOH-Gruppen der 16-Mercaptohexadecansäure immobilisiert wurde, um so  
30 die Polynukleotidsequenz durch die Avidin-Biotin-Bindung mit der sensitiven Oberfläche der Elektrode zu verknüpfen.

In Figur 2 wird die Detektion von DNA-Fragmenten auf der sensitiven Oberfläche gezeigt. Dazu wird ein Biosensor mit der Struktur  $\text{Au}(\text{Legierung})\text{-S-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CO-NH-DNA}$  verwendet und der Grad der DNA-Hybridisierung wird bei unterschiedlichen Konzentrationen komplementärer DNA durch die Kapazitätsänderung verfolgt. Diese Kapazitätsänderung zeigt  
5 den Grad der DNA-Hybridisierung an. Die vollständige Hybridisierung eines 22mer auf einem 24mer-Fragment wird innerhalb kurzer Zeit erreicht.

Die graphische Darstellung der Kapazitätsänderung in Figur 3 zeigt den Verlauf der Hybridisierung von Polynukleotiden an die aktivierte sensitive Oberfläche des Biosensors mit  
10 der Struktur  $\text{Pd/Au}(\text{Legierung})\text{-S-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CO-NH-Avidin-Biotin-Polynukleotid}$ , wobei die Kinetik der Hybridisierung als Kapazitätsänderung dargestellt wird, wenn konstante Mengen komplementärer oder teilweise komplementärer Polynukleotidsequenzen zu dem Biosensor mit der Struktur  $\text{Pd/Au}(\text{Legierung})\text{-S-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CO-NH-Avidin-Biotin-Polynukleotid}$  gegeben werden.

15

Figur 4 zeigt schematisch den Verlauf der Kapazitätsänderungen, wenn schrittweise der Biosensor mit der Struktur  $\text{Pd/Au}(\text{Legierung})\text{-S-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CO-NH-Avidin-Biotin-Polynukleotid}$  hergestellt wird.

20 Der Aufbau des Biosensors und das Verfahren zum Nachweis der Hybridisierung von Nukleinsäuren sind weiter unten beschrieben.

Für den Nachweis der Kapazitätsänderung der Hybridisierung, die in Figur 5 dargestellt ist, wurden zwei verschiedene Sensortypen verwendet:  $\text{Au}(\text{Legierung})\text{-S-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CO-NH-Oligonukleotidmonostrang}$  (24mer) (Quadrate) und  $\text{Pd/Au}(\text{Legierung})\text{-S-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CO-NH-Avidin-Biotin-Oligonukleotidmonostang}$  (24mer) (Kreise). Die Messungen wurden bei  
25 Raumtemperatur von 22°C durchgeführt. Bei beiden Systemen konnte gezeigt werden, daß nach Zugabe der komplementären Stränge eine Kapazitätsänderung auftritt, mit deren Hilfe die Hybridisierung nachgewiesen werden konnte.

30

Im Vergleich dazu zeigen die Ergebnisse, die in Figur 6 dargestellt sind, daß bei Zugabe von komplementärer (24mer) und nicht komplementärer Oligonukleotidsequenz (21mer) eine

starke Hybridisierung der komplementären Sequenz erhalten wird, wohingegen die nicht komplementäre Sequenz nur eine unspezifische Adsorption zeigt, die etwa halb so groß ist, wie die, die durch die Hybridisierung hervorgerufen wird.

- 5 In Figur 7 wird die Kapazitätsänderung beim Nachweis von Bakteriophagen mit einem Sensor der Struktur  $\text{Au-S-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CO-NH-Antikörper}$  bei Zugabe verschiedener Bakteriophagenkonzentrationen. Jedes dargestellte Symbol steht für eine Meßreihe.

- 10 Neben der Kopplung von Oligonukleotidmonosträngen mit  $\omega$ -funktionalisierten Alkylthiolen auf Gold oder anderen Metallen oder Legierungen über Avidin/Biotin und/oder  $\text{NH}_2$ -Gruppen können auch thiolmodifizierte Oligonukleotide zuerst auf Gold adsorbiert werden und die Lücken in der selbstorganisierenden Monoschicht mit stabilen Alkylthiolen aufgefüllt werden. Auch eine gleichzeitige Beschichtung mit HS-Spacer-Oligonukleotid und Alkylthiolen in einem bestimmten Verhältnis erzeugt die Monoschicht, die für das Nachweisverfahren mittels
- 15 Kapazitätsänderung erforderlich ist. In diesem Fall wird die Immobilisierung vereinfacht und es kann sofort die Hybridisierung, die weiter oben beschrieben ist, durchgeführt werden.

- Darüber hinaus kann die Hybridisierung und Immobilisierung durch Potentialänderungen gesteuert werden. Es wurde gefunden, daß das angelegte Potential sowohl einen Einfluß auf
- 20 die Immobilisierung von Oligonukleotidsträngen und Bakteriophagen als auch auf die Hybridisierung von Oligonukleotiden hat. Bereits von Kelley, S.O. et al. wurde in Langmuir 14 (1998), 6781-6784 beschrieben, daß sich doppelsträngige DNA-Helices in Abhängigkeit vom angelegten Potential aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphorsäurebausteine je nach Elektrodenpotential unterschiedlich auf der Elektrodenoberfläche orientieren. Darum kann die
- 25 Orientierung der DNA gesteuert werden, um so eine optimale Konfiguration für die Hybridisierung der Nukleinsäure-Moleküle auf der Elektrodenoberfläche zu erreichen.

- Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen klar, daß mit der erfindungsgemäßen Elektrode ein Biosensor oder eine DNA- Sonde bereitgestellt wird, mit der es mittels Messung der
- 30 Kapazitätsänderung möglich ist, die Sequenzen von DNA, RNA, PNA, Genabschnitten, genetische Defekte, Veränderungen der Sequenzen in bestimmten Genbereichen, Wirkungen

von Antikörpern/Antigenen nachzuweisen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß mit einem Elektrodenarray der Nachweis von vielen verschiedenen Fragmenten möglich ist.

Die erfindungsgemäße Elektrode mit der sensitiven Oberfläche eignet sich je nach Affinität ihrer Oberfläche zum Einsatz in der chemischen, medizinischen oder biologischen Analytik.

Die Geräteeinstellungen (20 Hz, +300 mV) wurden für eine Zwei-Elektrodenkonfiguration für sensitive Elektroden mit einer Oberfläche von ca. 1 bis 2 mm<sup>2</sup> optimiert. Bei sensitiven Elektroden mit einer größeren Oberfläche werden niedrigere Frequenzen für eine optimierte Messung benötigt, wohingegen sich kleinere Elektroden umgekehrt verhalten.

Im folgenden Beispiel wird die Herstellung eines Sensors für die Detektion der Hybridisierung von Polynukleotidsequenzen beschrieben.

Zunächst werden die sensitiven Elektroden wie folgt vorbereitet:

Silizium-Wafer-Stückchen mit einer Größe von 3,20 mm x 10,02 mm und einer Stärke von 450 µm wurden in einem allgemein üblichen Sputterprozeß oder Bedampfungsprozeß mit einer Elektrode der Größe 1,56 mm x 1,56 mm (reaktive Oberfläche) und einer Zuleitung von 10 µm Breite und 6,65 mm Länge versehen. Die Elektrode wurde aus Titan- und Palladiumschichten (Haftvermittler, jeweils 50 nm dick) und einer deckenden Schicht aus Goldlegierung (200 nm) aufgebaut. Als Kontaktstelle für das Meßsystem wurde am oberen Ende der Zuleitungen ein Silberdraht angelötet. Zuerst wurden die Wafer 30 Minuten vollständig in Chloroform p.a. getaucht. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom wurde der Wafer in eine 1:1 (v/v) Mischung aus Chloroform und Methanol getaucht und 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Analog zu dem verwendeten Chloroform kann bei diesem Reinigungsschritt auch Ethanol (99%) und eine 1:1 (v/v) Mischung aus Ethanol und Methanol verwendet werden. Der Wafer mit der Goldlegierung wurde für 5 Minuten in eine heiße 3:1 (v/v) Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung getaucht. Die Elektroden wurden gründlich mit Reinstwasser (Millipore: Mili.QPlus-185; 18,2 MΩ·cm<sup>-1</sup>) gespült und getrocknet. Alle Glas- und Teflongeräte wurden vor ihrer Verwendung in analoger Weise gereinigt.

Anschließend werden die Elektroden wie nachfolgend beschrieben beschichtet:

Zur Beschichtung wurde eine Chloroform-Lösung verwendet, die 5 mM 16-Mercaptohexadecansäure enthält. Durch 15-stündiges Eintauchen des Wafers bei Raumtemperatur in die ungerührte Beschichtungslösung wurde die Oberfläche der Elektrode mit Alkylthiol beschichtet. Zum Entfernen überschüssiger, auf der Oberfläche haftender Moleküle wurde die Elektrode 15 Sekunden mit Chloroform gespült. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom und mehrmaligem Waschen mit Reinstwasser wurde die Elektrode in die Meßzelle eingebaut.

Die Messung wird folgendermaßen durchgeführt:

Die Waferplatte mit der alkylthiolbeschichteten Elektrode wurde gemeinsam mit einer AG/AgCl-Referenzelektrode (Oberfläche ca.  $1 \text{ cm}^2$ ) an einem Teflonhalter befestigt, der als Deckel für die Meßzelle (Eppendorfcup 1,5 ml) dient und eine Öffnung für die Zugabe und Entnahme von Flüssigkeiten besitzt. Die Zelle wurde mit Elektrolyt (100 mM KCl, pH 5,1, ca. 200 bis 300  $\mu\text{l}$ ) soweit gefüllt, daß die reaktive Oberfläche der Goldelektrode und die Referenzelektrode (Ag/AgCl) vollständig eingetaucht waren. Für eine gleichbleibende Durchmischung wurde ein Magnetrührer verwendet. Ein Lock-in-Verstärker mit integriertem Sinusgenerator erzeugte ein konstantes Sinussignal mit einer Frequenz von 20 Hz und einer Amplitude von 10 mV. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt. Der Lock-in-Verstärker wird auch zur Registrierung des kapazitiven Stroms verwendet. zusätzlich zu der Wechselspannung wird eine Gleichspannung über einen Spannungsgeber angelegt. Die Adsorption von Molekülen auf der Elektrodenoberfläche wurde mittels Kapazitätsänderung gemessen. Dazu wurde das Meßsignal auf einem x-t Schreiber aufgezeichnet und über einen 16 bit A-D Umwandler auf den Rechner übertragen. Zu Beginn der Messung wurde die absolute Kapazität der beschichteten Elektroden bei einem elektrischen Potential von +300 mV bestimmt.

Daran schließt sich die Immobilisierung der Oligo- und/oder Polynukleotidsequenzen an:

Die Immobilisierung von Polynukleotidsequenzen erfolgte auf 2 unterschiedliche Arten. Bei der Verwendung von aminoterminalen Sequenzen wurde zuerst die endständige COOH-Gruppe der Mercaptohexadecansäure aktiviert. Die Aktivierung wurde beispielsweise mit N-Hydroxysuccinimid erreicht. Dazu wurden die beschichteten Elektroden in 5 ml Dioxan getaucht und die Lösung 10 Minuten gerührt. Nach Zugabe von 50 mg Dicyclohexylcarbodiimid und 25 mg N-Hydroxysuccinimid wurde die Lösung für 4 weitere Stunden gerührt. Nach der Reinigung der aktivierten Elektrode mit Dioxan und Methanol wurde sie in die Meßzelle gegeben. Die Kapazitätsänderung bei Zugabe einer aminofunktionalisierten DNA-Sequenz gibt die Immobilisierungsrate an.

Wird wasserlösliches Carbodiimid EDC als Reagenz verwendet, so kann die Immobilisierung direkt in der Meßzelle ohne externe Aktivierung erfolgen.

Bei Verwendung von biotinylierten Polynukleotidsequenzen wird die Immobilisierung von Avidin an die aktivierten endständigen COOH-Gruppen der Mercaptohexadecansäure notwendig, wobei die Polynukleotidsequenz nach Spülen und Pufferwechsel durch die Avidin-Biotin-Bindung mit der Oberfläche verknüpft wurde.

Der Nachweis der Hybridisierung wird wie folgt durchgeführt:

Alle Hybridisierungsmessungen wurden mit Elektroden aus Palladium-Gold-Legierungen, Goldelektroden und Palladiumelektroden durchgeführt.

Die Detektion von DNA erfordert den Aufbau einer sensitiven Oberfläche, wie sie weiter oben beschrieben ist. Die Messung erfolgt in einem Eppendorf-Cup, der 350 µl Puffer (pH 7,1; 100 mM NaCl; 5 mM Imidazol) enthält. Zu einem Biosensor mit der Struktur Au(Legierung)-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CO-NH-DNA oder Au(Legierung)-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CO-NH-Avidin-Biotin-DNA werden unterschiedliche Konzentrationen an komplementärer DNA gegeben und die Hybridisierung mittels Kapazitätsänderung gemessen (Figur 2). Bei Zugabe einer konstanten Menge des komplementären Stranges wurde die Kinetik der Hybridisierung kapazitiv gemessen. Die Zugabe nicht-komplementärer DNA und RNA zeigt hingegen keine oder geringe Kapazitätsänderungen.

Zu einem Biosensor der Struktur  $\text{Au}(\text{Legierung})\text{-S-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CO-NH-DNA}$  werden unterschiedliche Mengen eines komplementären 22mer-DNA-Fragmentes gegeben und die Hybridisierung mittels Kapazitätsänderung verfolgt (Figur 3).

5

Ebenfalls konnte ein System mit einem HS-Spacer-Oligonukleotid (poly A) und Oktanthiol gezeigt werden, daß eine Immobilisierungsschritt nicht erforderlich ist, bei Zugabe des komplementären Stranges poly T wurde eine Kapazitätsänderung von mehreren Prozenten erreicht.

10

Eine weitere Möglichkeit die Hybridisierung von Oligo- oder Polynukleotiden mittels elektrochemischer Methoden nachzuweisen, besteht darin, daß zuerst ein Nukleotiddoppelstrang auf der Elektrode immobilisiert wird. Einer der beiden Stränge verfügt über mindestens eine funktionelle Gruppe, die über eine chemische Kopplung an die endständigen Gruppen der Monoschicht bindet. Besitzt der Nukleotidstrang z.B. eine Thiolgruppe, kann er direkt auf die Metalloberfläche der Elektrode aufgebracht werden. Erfolgt nun die Denaturierung des gebundenen Doppelstranges durch Temperaturerhöhung oder andere Methoden, bleibt nur der gekoppelte Einzelstrang auf der Elektrodenoberfläche in orientierter Form zurück. Nach dem Wechsel der Elektrolytlösung, wobei die freie Nukleotidsegmenten entfernt werden, kann der zugehörige komplementäre Strang nun detektiert werden.

15

20

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen klar, daß mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung, ein Nachweissystem geschaffen werden konnte, mit dem alle Nachteile, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, überwunden wurden und die durch eine hohe Selektivität und Spezifität ausgezeichnet ist. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß die Hybridisierung von Oligo- und Polynukleotide mittels elektrochemischer Messungen nachgewiesen werden kann, ohne daß strenge Einschränkungen in der Größe und Geometrie der sensitiven Oberfläche oder die Nachteile, die bei Verwendung von radioaktiv markierten Verbindungen hingenommen werden müssen, auftreten.

25

30



**Vorrichtung zur Detektion von Oligo- und/oder Polynukleotid-Hybridisierungen**

5

**Ansprüche**

1. Vorrichtung zum Nachweis von Oligo- und/oder Polynukleotiden, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Elektrode mit einer sensitiven Oberfläche aufweist.
- 10 2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die sensitive Oberfläche der Elektrode aus einem Metall oder einer Metall(Legierung) besteht, auf der eine organische Monoschicht oder eine organische Monoschicht mit einem Rezeptor aufgebracht ist.
- 15 3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Monoschicht oder die organische Monoschicht mit Rezeptor über eine Schwefel-Metall-Bindung an die Elektrode gebunden ist.
- 20 4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Metall(Legierung) mit einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus HS-X, S=X, X-S-S-Y oder XSi(R<sub>3</sub>), wobei X und Y beliebige Molekülfragmente darstellen, insbesondere funktionalisierte oder unfunktionalisierte Alkylfragmente, quervernetzende Verbindungen, insbesondere solche, die konjugierte Doppel- und/oder
- 25 Dreifachbindungen aufweisen oder Epoxyde und R für -OH und/oder ein und/oder mehrere identische und/oder verschiedene Halogene steht, beschichtet ist.
- 30 5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß organische Moleküle, insbesondere Alkylthiolverbindungen auf der Metall(Legierung) eine Monoschicht ausbilden, an die dann komplementäre oder teilweise komplementäre Oligo- und/oder Polynukleotide, wie DNA, RNA, PNA, sowie Antikörper/Antigene der

nachzuweisenden Verbindungen, wie DNA, RNA, PNA, Viren, Phagen, Prionen, Antikörper/Antigene kovalent gebunden sind.

- 5 6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Metall(Legierung) mit einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 16-Mercaptohexadecansäure, 16-Mercaptohexadecanamin,  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-(\text{SiR}_2-\text{O}-\text{SiR}_2)_m-(\text{CH}_2)_w-\text{SH}$ , wobei  $n=2$  bis 25,  $m=1$  bis 10,  $w=2$  bis 25 darstellen, die Monoschicht ausbildet.
- 10 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Material für die Elektrode, ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus einem Metall, insbesondere Ag, Au, Pt, Pd, einer Legierung, insbesondere Au/Pd, Ag/Pd, Au/Cr, einem Halbleiter, insbesondere GaAs, Si, Ge.
- 15 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode die Struktur  $\text{Pd}/\text{Au}(\text{Legierung})-\text{S}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-\text{NH}-\text{Polynukleotid}$ , wobei  $n=2$  bis 30 ist, aufweist.
- 20 9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode die Struktur  $\text{Pd}/\text{Au}(\text{Legierung})-\text{S}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-\text{NH}-\text{Avidin-Biotin-Polynukleotid}$ , wobei  $n=2$  bis 30 ist, aufweist.
- 25 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierung von komplementären oder teilweise komplementären Oligo- und/oder Polynukleotidsequenzen, wie DNA, RNA, PNA, sowie Antikörper/Antigene, Viren, Phagen, Prionen der nachzuweisenden Verbindungen mittels elektrochemischer Meßmethoden detektiert werden.
- 30 11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierung von komplementären oder teilweise komplementären Oligo- und/oder Polynukleotidsequenzen mittels kapazitiver Meßmethoden, Impedanzmessungen,

Voltammetrie, Messung nicht-linearer Impedanzeigenschaften, Chronoamperometrie, Chronopotentiometrie detektiert wird.

- 5 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus mehreren Elektroden mit sensitiven Oberflächen besteht.
13. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 als Biosensor.
14. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 als Chemosensor.
- 10 15. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 als DNA-Sonde.
16. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 als Multisensorarray mit mehreren sensitiven Elektroden zum Nachweis gleicher und/oder verschiedener  
15 Oligo- und/oder Polynukleotidsequenzen, wie DNA, RNA, PNA, sowie Antikörper/Antigene, Viren, Phagen, Prionen in einem oder mehreren Verfahrensschritten.

1/4

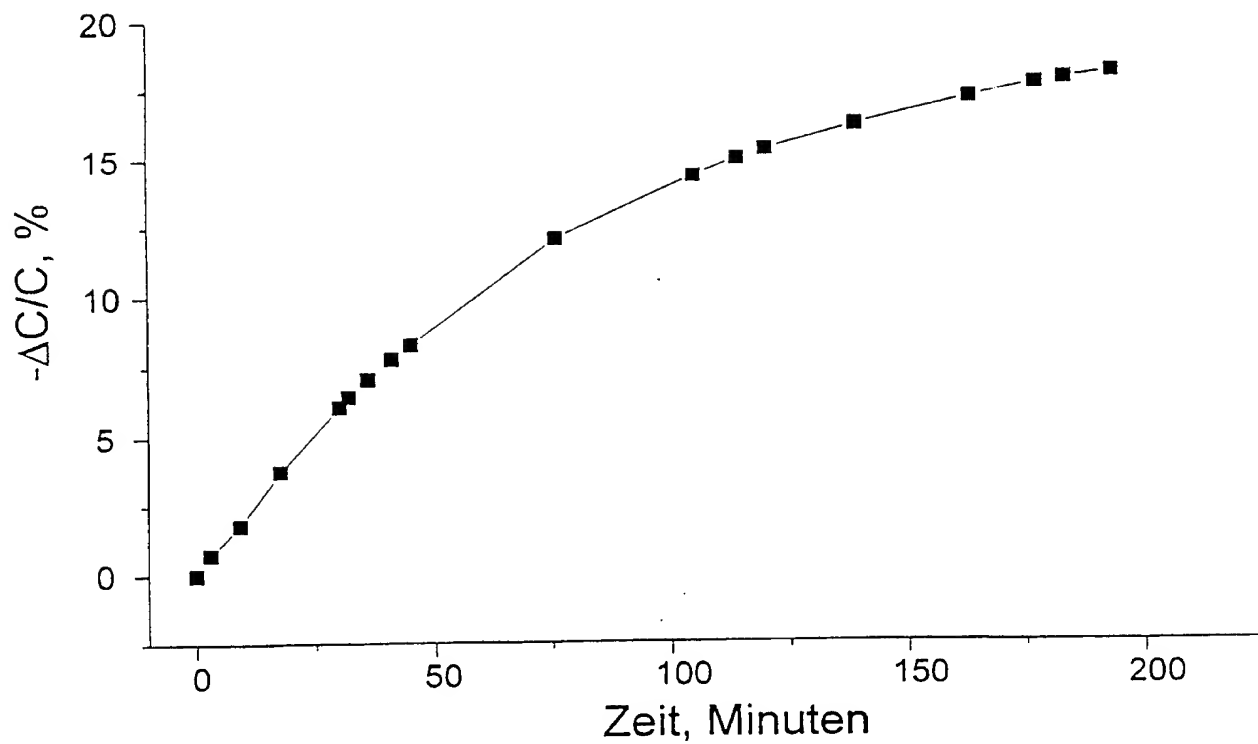


Fig. 1

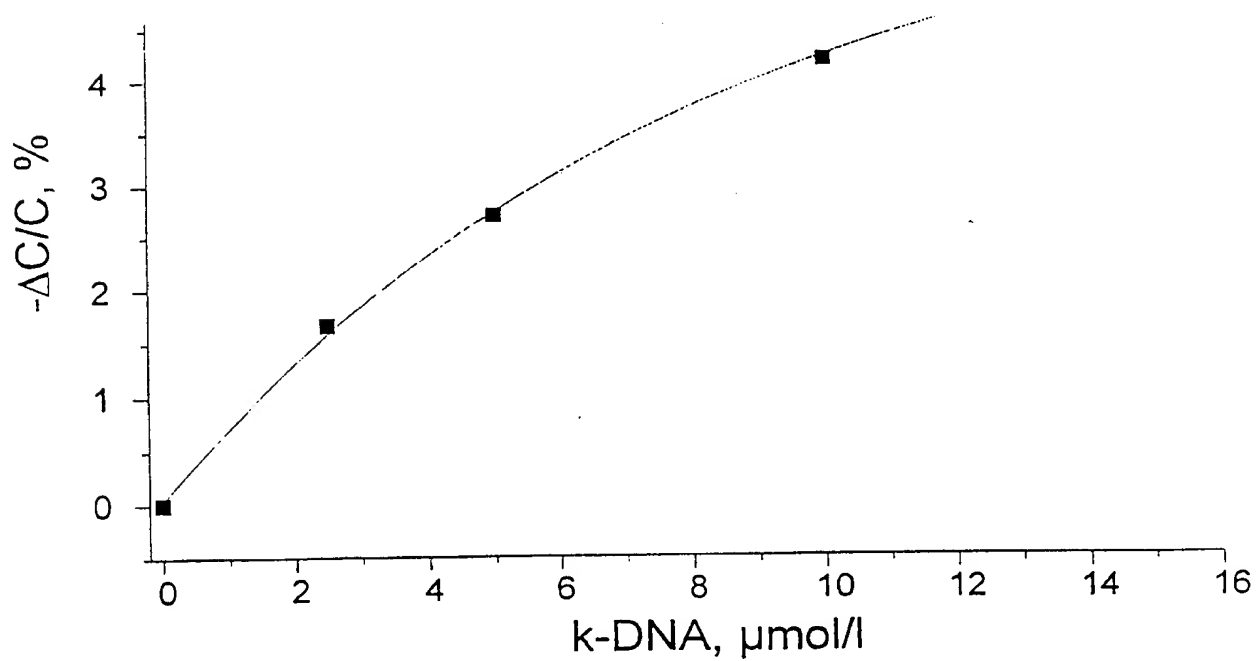


Fig. 2

2/4

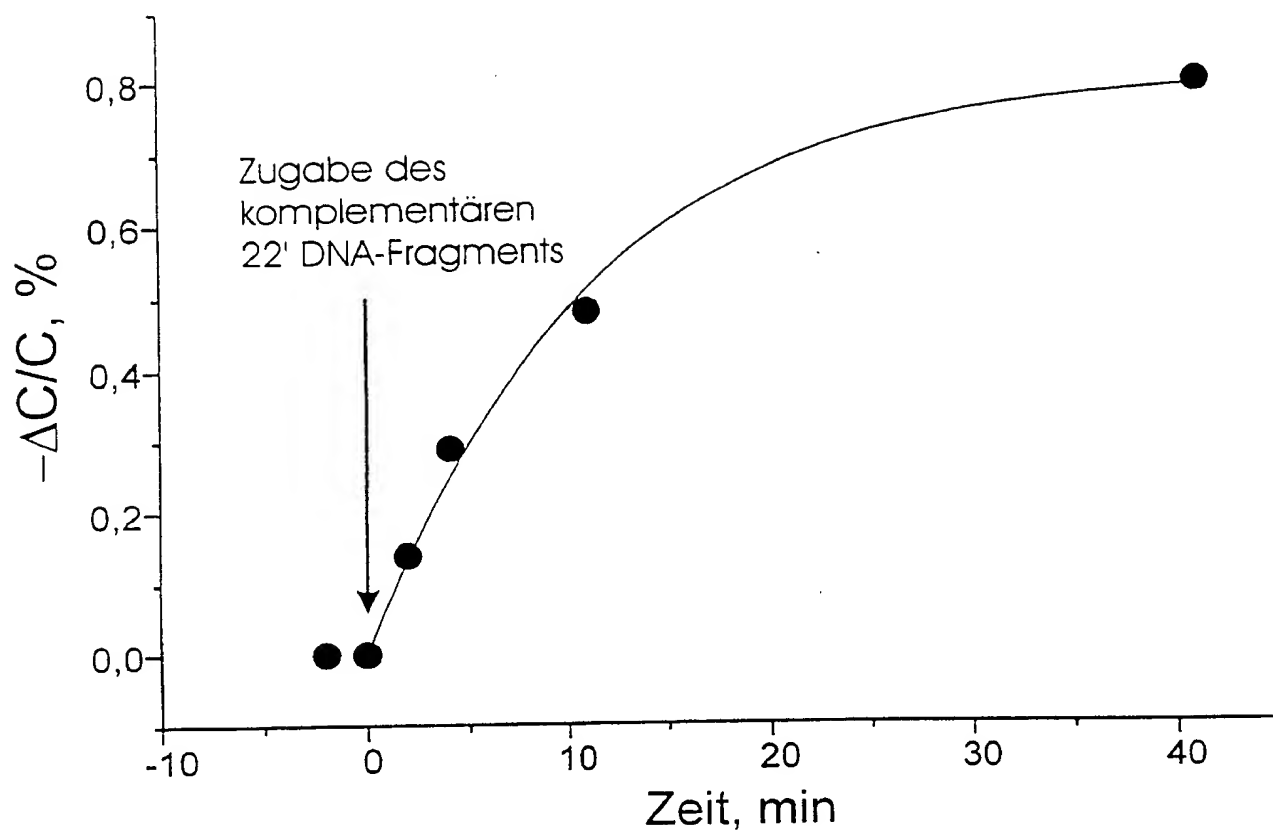


Fig. 3

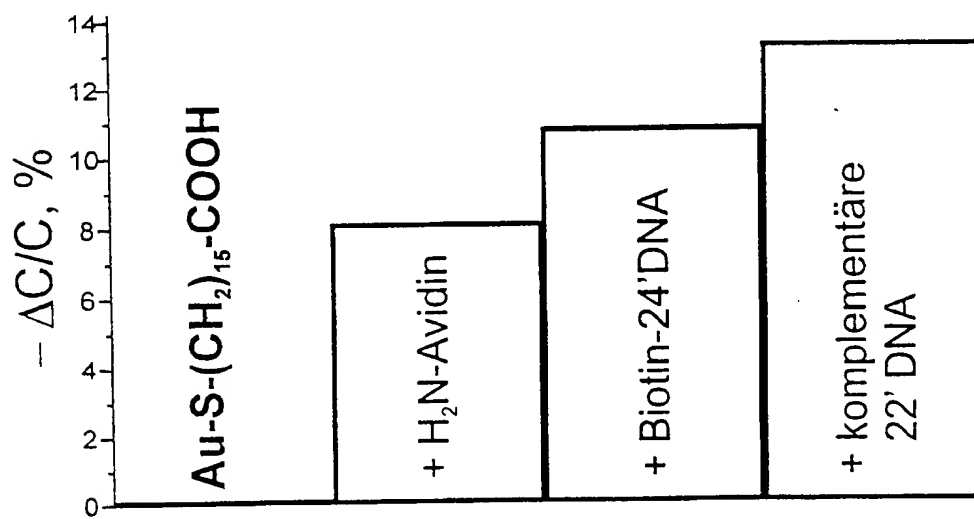


Fig. 4

Bindungsschritte

3/4

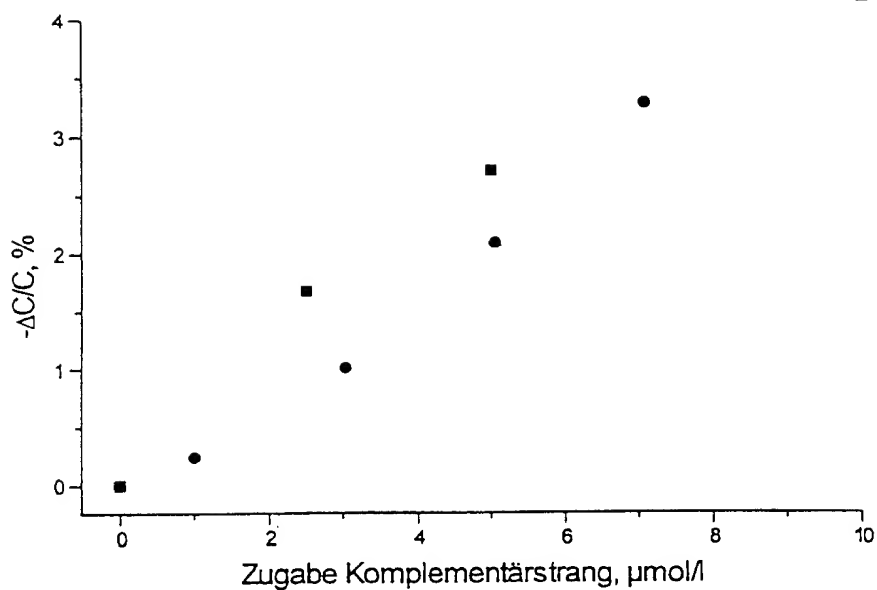


Fig. 5

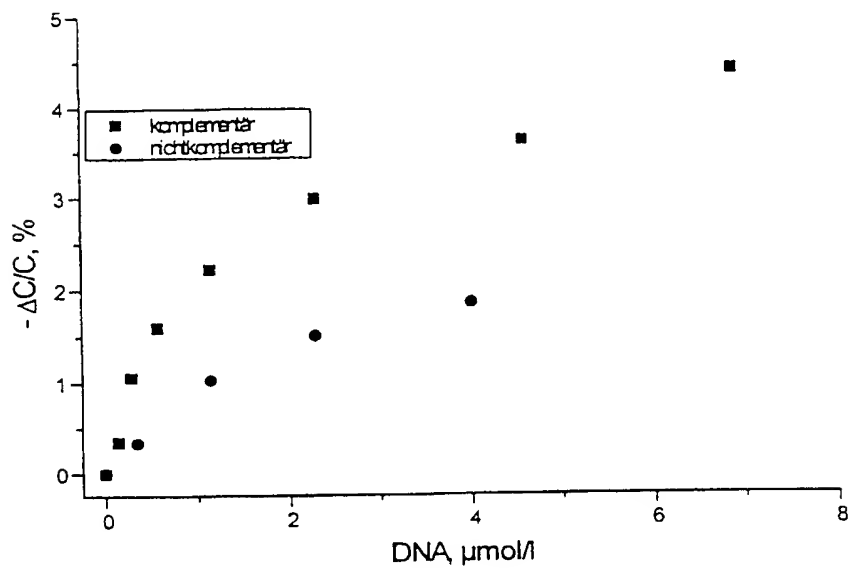


Fig. 6

533 Rec'd PCT/PTO 14 AUG 2000